

## 遺伝子検出法の現時点における評価及び今後の取組について

### 1. 各協力機関における評価について

各協力機関におけるクリプトスポリジウム等遺伝子検出法の評価結果は、各機関記入の評価シート（資料 2）にあるとおり、いずれの機関においても使用可能であることを示す内容であった。

各機関における評価内容の概要は以下の通りであった。

東京都健康安全研究センター及び神奈川県内広域水道企業団は、厚生労働科学研究（「飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」（松井班））での遺伝子検出法の実地試験に協力を頂いてきたところであり、今般の検証において引き続きデータの拡充をお願いしたところ。当該 2 機関における河川水等より得た実試料については LAMP 法のみならず RT-PCR 法の検討にも使用し、LAMP 法と RT-PCR 法の陽性陰性に関する定性的な結果がおおむね一致することを確認した。また、PCR 産物から塩基配列決定を行ない、クリプトスポリジウムはクリプトスポリジウムの配列が、ジアルジアはジアルジアの配列が得られ、一連の反応の特異性に問題がないことが確認されている。

国立保健医療科学院では RT-PCR 法を中心に行っているが、LAMP 法と陰性陽性に関する定性的な結果がおおむね一致することを確認した。また、計数に関する定量的な検討結果が得られており、顕微鏡検出法に基づく推定値が遺伝子検出法の定量推定値とおおむね一致していた。別機関の添加回収試験でも、添加数と遺伝子検出法の定量推定値がおおむね一致する結果が得られており、RT-PCR 法による定量が可能であることが示された。

財団法人岐阜県公衆衛生検査センターは LAMP 法、株式会社環境科学研究所は LAMP 法と RT-PCR 法、愛媛県立衛生環境研究所、神奈川県衛生研究所、東京都水道局は RT-PCR 法の添加回収試験を行なった。遺伝子検出法において検出されること、添加数に対応した遺伝子検出法の定量推定値が得られることを確認した。

### 2. 検証で得られた成果について

遺伝子検出法の検証過程で得られた成果として、いくつか改善点が見つかった。

具体的には免疫磁気ビーズを含む試料をそのまま核酸抽出した際に、核酸が吸着されて定量ができなくなるということが分かってきた。免疫磁気ビーズでクリプトスポリジウム等を精製した際、手順を短縮して免疫磁気ビーズと結合

した状態で核酸抽出を行っていた機関においては、検証作業の結果において、定量が困難との結果が得られた。一方、免疫磁気ビーズからクリプトスポリジウムを塩酸解離した機関では定量が可能であった。このため、免疫磁気ビーズ法による精製は塩酸解離を行う方法とし遺伝子検出法の手順に反映させることが適当と考えられる。陰性陽性に関する定性的な試験法としての活用を想定している LAMP 法においても、定量推定値を示すためにも免疫磁気ビーズ法による精製において塩酸解離を行うことを標準的な方法とすることが適当と考えられる。

次に、阻害物質の影響を低減するための、反応に持ち込む試料を減らすことを一部の機関から提案いただいている。一般に遺伝子検出法では 1 ないし 5  $\mu$  L 程度の試料を用いて 20  $\mu$  L の試薬と混合して 25  $\mu$  L の反応液中で遺伝子増幅反応を行う。この時、試料が多ければ検出感度が向上するが、一方で夾雑物も多く混入して遺伝子増幅反応が阻害されるおそれがある。今回の検証にあたり、当初は、試料の添加量について 5  $\mu$  L の使用を想定していたが、反応が遅れたり、夾雑物により阻害されたりすることが見られ、一方、試料の添加量 1  $\mu$  L ではそのような問題は少なかった。以上のことから、試料の添加量は少なくし、1~2  $\mu$  L 程度が適当と考えられた。

遺伝子検出法には試薬 2 製品を使用していずれも可能なことが示された。クリプトスポリジウム、ジアルジアを添加回収実験と、河川水中から得た試料の試験両方で、クリプトスポリジウム等の陰性陽性に関する定性的な結果を示すことができた。それぞれの試薬の特異性に問題がないことも相互に確認し、さらに PCR 産物から塩基配列決定を行って、クリプトスポリジウムはクリプトスポリジウムの配列が、ジアルジアはジアルジアの配列が得られ、一連の反応の特異性に問題がないことを確認した。検討課題となっていた RT-PCR 法の定量性について、先行的な結果が得られ、河川の実試料での顕微鏡検出法に基づく推定値が遺伝子検出の定量推定値と対応した。

### 3. 今後の取組について

各機関におけるクリプトスポリジウム等の遺伝子検出法に基づく評価結果は概ね良好であったが、検証過程において、若干の改善点が明らかになったことから、この点を踏まえて遺伝子検出法の手順に関するマニュアルの検討において反映することが必要と考えられる。

添加回収試験、実試料を用いた試験で所定の成果が得られて問題がないことが示された。偽陽性、偽陰性などが生じないか今後とも積み重ねていくことが大切と考える。

遺伝子検出法はこれまで、水道事業体において利用されていなかった方法で

あり、新たな検査法の導入に際して何らかの課題が生じることが予想される。また、衛生研究所や水道法に基づく登録水質検査機関においては食品分野等の検査を実施するにあたり遺伝子検出法に習熟している機関も存在するが、数十Lの多量な試料中にわずか1オーシスト、シストの存在を、定性的かつ定量的に検査しようとすることは容易ではなく、注意深く試験を行うことが求められる。

平成19年の「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」において、水道原水の検査を求めており、今般の検査機関による試験結果から、原水の試験の実施には問題なく利用することが可能であり、多検体処理の点から遺伝子検出法の活用が有用と考えられる。その一方、浄水の検査においては、大量の清浄水の中から1オーシスト、シストの存在を確認することから、注意深く試験を行うことが求められ、当面、遺伝子検査法で検出された場合には、同試料を顕微鏡検出法で結果を確認することが適当と考える。